

## OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES DIRIGIDOS CONTRA ANTIGENOS SOLUBLES DE *P.falciparum*

ZULEIMA RUBIO\*, MOISES WASSERMAN L.\*\*\*, MIGUEL GUZMAN U.\*\*\*

En este trabajo, se describe la producción de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas solubles de *P.falciparum* (FCB-1). Uno de los anticuerpos identificados como M-45 detectó una proteína de 72 Kd y dos más de menor peso molecular de 30 y 26 Kd, y el otro, identificado como G-172, detectó una proteína de 120 Kd, cuando se enfrentaron a un extracto de esquizontes por inmunoelectrotransferencia.

Estos anticuerpos monoclonales mostraron patrones de fluorescencia diferente en eritrocitos infectados con esquizontes; M-45 (isotipo M) produjo una fluorescencia uniforme y generalizada, mientras que el G-172 (isotipo G2a) mostró regiones con parches de mayor intensidad.

Posteriormente, los monoclonales se utilizaron en una prueba de ELISA sandwich, como anticuerpos de captura para antígenos solubles de *P. falciparum*, en sobrenadantes de cultivo y en cinco sueros de pacientes con infección malárica aguda. Los resultados mostraron un 100% de sensibilidad y especificidad para la dilución 1/20 de los sueros y un 80% de sensibilidad para la dilución 1/40.

Teniendo en cuenta estos resultados preliminares se abre la posibilidad de utilizar estos monoclonales en una prueba de ELISA que permita el seguimiento de una infección malárica.

### INTRODUCCION

La identificación de proteínas de parásitos de malaria mediante el uso de anticuerpos monoclonales (Acs. M.) ha llevado a aclarar y estudiar mejor su biología y comportamiento, como también a pensar en la posibilidad del mejoramiento de las técnicas de diagnóstico.

Durante el rompimiento de los esquizontes, en el ciclo asexual del *P. falciparum* se liberan un grupo de partículas proteínicas solubles o exoantígenos (P.S)

(1), que se derivan posiblemente de la cubierta externa de los merozoítos liberados, cuando éstos invaden nuevos eritrocitos y/o a partir de las membranas de los eritrocitos infectados con esquizontes (2,3). Estas proteínas son detectables en la circulación del huésped infectado (4) y en el medio de cultivo de los parásitos (5,6) y su función exacta es aún imprecisa.

La demostración de antígenos, ha llegado a ser de gran utilidad en el diagnóstico de las enfermedades parasitarias, porque ellos están más altamente relacionados con la enfermedad activa de lo que están los

\*Bacterióloga MS. Jefe Laboratorio Control de Calidad de Vacunas INS.

\*\*Jefe Grupo de Bioquímica INS.

\*\*\*Jefe Grupo de Inmunología INS. Editor Revista Biomédica.

anticuerpos (7). En el caso de malaria, las pruebas de ELISA evalúan la memoria inmunológica de un paciente, es decir, determinan si un paciente ha tenido malaria en una ocasión reciente, pero no si la infección malarica es activa. Por otro lado, el número de parásitos detectados en sangre periférica es inferior al real en algunos casos, especialmente cuando el paciente ha tomado alguna droga antimalárica. Estos hechos significan una verdadera dificultad en el diagnóstico de la malaria.

Los Acs. M. han demostrado ser una herramienta invaluable para la caracterización de antígenos de los diferentes estadios del *P. falciparum* (8, 9, 10). Por ejemplo, la glicoproteína P-195 ha sido caracterizada y se ha determinado su procedencia a partir de esquizontes y merozoítos (11, 12).

Teniendo en cuenta la presencia de proteínas (Ps) derivadas del parásito en los sobrenadantes de cultivo, en el suero de pacientes con malaria y su presencia algún tiempo después del tratamiento con cloroquina (13); pensamos en producir Acs. M. que estuvieran dirigidos contra algunas de estas proteínas. Esto con el fin de utilizarlos en una prueba de ELISA. En 1987, se desarrolló una prueba inmunoradiométrica para detección de antígenos de *P. falciparum* en sangre; mediante el uso de Acs. M. y policlonales, observándose una buena correlación con las parasitemias.

Con *P. Yoelii* también se ha utilizado una prueba inmunoenzimática con Acs. Monoclonales para detección de proteínas solubles en sueros de ratones infectados (14). Otro ejemplo en un área diferente, es un ELISA para detección de antígenos de *Tripanosoma* en la enfermedad del sueño, observándose resultados preliminares prometedores (15).

## MATERIALES Y METODOS

### 1. CULTIVO Y CONCENTRACION DE PARASITOS DE *P. falciparum*.

La cepa de *P. falciparum* (FCB-1) fue cultivada según el método de Trager y Jensen (16), con suero humano al 10%. Cuando las parasitemias alcanzaron de 5-10%, encontrándose los esquizontes en mayor proporción, éstos se concentraron mediante gradientes de Percoll (17).

### Obtención de antígenos

Después de concentrados y lavados, los parásitos se trataron con una sol. de saponina al 0.15% (18) en inhibidores de proteasas: PMSF 1 mM, TPCK 0.11 mM, TCLK 0.1 mM, Ac. aminocaproico 2 mM, EGTA 5 mM, Incubando a 37°C durante 25 minutos. Los parásitos libres se lavaron para ser pasados a través de agujas No. 27 y finalmente ser agitados para la liberación de proteínas solubles.

Para la liberación espontánea de las mismas proteínas, los esquizontes concentrados fueron devueltos al cultivo en medio sin suero. Después de 2, 4, 8 horas, se colectaron los sobrenadantes por centrifugación a 1200 y 2800 xg, y se trataron con los inhibidores de proteasas ya descritos. Luego de liofilizarlos, fueron desalinizados mediante el paso por columnas PD-10 (Sephadex G-25), determinándose la concentración de proteínas por el método de Bradford (19). Las proteínas se conservaron en alícuotas a -20°C.

**ELISA:** después del tratamiento con saponina 0.15%, los parásitos fueron sonicados a 40 pulsos por minuto, (Sonicador heat systems-ultrasonics, Mod. W-225), manteniéndolos en hielo. Inmediatamente, se centrifugaron a 150 xg durante 30 min. El sobrenadante se fraccionó y se conservó -20°C.

**IFI:** los parásitos concentrados se lavaron y suspendieron en medio de RPMI 1640, más bicarbonato 32 mM, en una concentración de  $20 \times 10^6$  cel./ml. De esta suspensión se sirvieron 20 µl en láminas pretratadas con solución tampón de carbonatos pH 9.6, y se dejaron secar para ser conservadas a -20°C.

Para la electroforesis y la inmunotransferencia (20, 21), se utilizaron los extractos obtenidos anteriormente, como se describirá más adelante.

### 2. INMUNIZACIONES EN RATONES

Se inmunizaron ratones Balb/c de 8-12 semanas, utilizando una mezcla de proteínas solubles en adyuvante completo e incompleto de Freund (50-100 µg o 1,5 a  $10 \times 10^6$  parásitos). Se hicieron 3 inoculaciones con intervalos de 10 días IDM, IP y una al mes, en un volumen 0.2 ml. Cuando el título de anticuerpos fue mayor de 1/200 por ELISA y mayor de 1/100 por

IFI, los ratones fueron desafiados con  $20 \times 10^6$  parásitos y 100 ug de P.S por punción intravenosa, 3 días antes de la fusión.

#### Inmunizaciones en conejos para obtención de suero anti-*P. falciparum*

Tres conejos de 3-4 Kg fueron inmunizados 2 veces con intervalos de un mes, por punción intramuscular con esquizontes concentrados, y adyuvante completo e incompleto de Freund. La concentración aproximada de proteínas inoculadas fue de 150 ug por conejo, en un volumen final de 1 ml. Cuando el título de anticuerpos por ELISA fue mayor de 1/500 se hizo un refuerzo y se sangraron para concentración de inmunoglobulinas G anti- *P. falciparum*.

#### Separación de IgG anti-*P. falciparum*

Para la separación de Igs. G por el método de ácido octanoico o caprílico (22), se hizo un "pool" de sueros de los tres conejos, se llevó a pH 4.8 con ácido acético IN y luego 6 ml de ácido octanoico por cada 100 ml de suero. Después de centrifugar a 10000 xg durante media hora se recolectó el sobrenadante en donde se encontraba aproximadamente un 90% de Ig G y luego se dializó contra una solución tampón de fosfatos.

### 3. PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-*P. falciparum*

#### Obtención de células del bazo de ratones inmunizados

A los ratones previamente inmunizados se les extrajo el bazo, se maceró y suspendió en medio D-MEM y se trató con una solución de tris-NH<sub>4</sub>Cl 10 mM pH 7.0; para lisar los eritrocitos. Después de lavar las células, se resuspendieron en medio D-MEM y se diluyeron para contarlas en cámara de newbawer. Para determinar el porcentaje de viabilidad se diluyeron con una solución de azul de tripán al 0.2%.

#### Obtención de células de mieloma P3.X 63.Ag.8.653

Las células de mieloma se cultivaron en medio D-MEM suplementado con glutamina 20 mM, sulfato de gentamicina 40 ug/ml y suero fetal bovino (SFB)

al 10%, a 37 grados C y 5% de CO<sub>2</sub>. Periódicamente las células fueron tratadas con una solución de 8-azaguanina 10 mM al 1% para eliminar posibles revertantes. El recuento celular se hizo de igual manera con las células del bazo de los ratones.

#### Obtención de células alimentadoras

Ratones desnudos Balb/c, de aproximadamente 5 meses de edad, fueron sacrificados después de 4 días de haber sido inoculados con 0.5 ml de SFB intraperitonealmente. Posteriormente se hicieron 3 lavados peritoneales con 10 ml de medio D-MEM frío. Los macrófagos peritoneales se lavaron y se colocaron en hielo, hasta el momento de la fusión.

#### Fusión

Las células del bazo de ratón inmunizado y las células de mieloma, se mezclaron en una proporción de 2:1, respectivamente y se centrifugaron a 459 xg durante 5 min. Al sedimento obtenido se le agregó una solución de polietilenglicol (PEG 1500 de Sigma), al 45% y dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% en solución salina al 0.9% (23). Después de un minuto se agregaron 12 ml de medio D-MEM. Las células fusionadas se dejaron en reposo durante 2 minutos y se centrifugaron a 160 xg durante 4 minutos, y al sedimento se le agregaron  $5 \times 10^6$  células alimentadoras. Finalmente, las células fueron suspendidas en medio de hibridomas: D-MEM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales al 0.01%, piruvato de sodio 1 mM, solución HAT (Hipoxantina  $1 \times 10^{-2}$  M, aminopterina  $4 \times 10^{-3}$  M, timidina  $1.6 \times 10^{-3}$  M), solución de insulina 0.2 uds/ml, oxalacetato 0.15 mg/ml, sulfato de gentamicina 40 ug/ml SFB 20%, 2 mercaptoetanol  $1 \times 10^{-5}$ . De esta suspensión se colocaron 150 ul/pozo en placas de 96 pozos, con una concentración de  $1 \times 10^{-5}$  células/pozo. Las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta observar la aparición de híbridos. Aproximadamente 2 semanas más tarde, se evaluó la producción de anticuerpos por ELISA e IFI.

#### Seguimiento de la producción de anticuerpos monoclonales

##### Por ELISA

A placas de poliestireno de 96 pozos, fondo plano, se les adhirió una dilución de extracto de esquizontes

en una solución tampón de carbonatos 50 mM pH 9.6, según título previo contra sueros de ratones inmunizados.

Igualmente se adhirió extracto de membranas de eritrocitos normales. Después de lavar con solución salina tampón (PBS), 0.05% Tween y albúmina bovina sérica al 0.1%; se agregaron los sobrenadantes de los hibridomas, incubando durante la noche a 4°C. Se usó control S. positivo, (fusión) y normal, ambos diluidos 1/10, 1/100 y 1/200; además sobrenadantes de células de mieloma. Después de la segunda lavada se agregó conjugado anti-IgG molécula completa, marcada con fosfatasa alcalina diluido 1/800. Esta mezcla se incubó durante dos horas a temperatura ambiente, y se lavó para agregar el sustrato PNP 1 mg/ml diluido en solución de dietanolamina pH 8.6.

Luego de parar la reacción con soda 3N, se leyeron las densidades ópticas en un espectrofotómetro TOYO ELISA ANALYZER A 405 nm.

#### *Por IFI*

Los pozos positivos por ELISA fueron evaluados contra impresiones de eritrocitos infectados y no infectados en láminas para IFI. Los sueros controles se diluyeron 1/100 con PBS pH 7.4. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, se lavaron las láminas y se agregó conjugado anti-Igs de ratón marcado con fluoresceína diluido 1/40 con azul Evans 1/10000. El conjugado se incubó durante una hora y se lavó para luego montar las láminas, y observarlas al microscopio.

#### **Concentración y expansión de los híbridos seleccionados**

Para obtener un solo clono a partir de los pozos con híbridos, éstos se clonaron por dilución límite (24). Los híbridos positivos seleccionados fueron contados y diluidos hasta una concentración de 3 células/ml. Se dispensaron 200 µl/pozo y adicionando macrófagos peritoneales. Los pozos que mostraron crecimiento de un solo clono de células fueron evaluados para la producción de Acs. M por ELISA e IFI. Aquellos que fueron positivos fueron expandidos a placas de 24 pozos y botellas de 4 onzas para colectar los sobrenadantes y conservar las células para criopreservación.

#### **Concentración de los ACS.M. a partir de los sobrenadantes**

Los sobrenadantes de los cultivos positivos se colectaron y concentraron con sulfato de amonio saturado en PBS, y en partes iguales. La mezcla se dejó en agitación durante la noche a 4°C, luego se centrifugó a 12000 xg durante 45 minutos. El sedimento obtenido se disolvió y dializó contra PBS 0.01 M, pH 7.2. La concentración de proteína se estimó mediante lectura de la absorbancia a 280 nm.

#### **4. CARACTERIZACION DE LOS ACS. MONOCLONALES**

##### **Determinación de la subclase y tipo de cadena liviana**

Los sobrenadantes concentrados se incubaron con tiras de un Kit comercial, (Mouse monoclonal antibody isotyping Kit-Amersham), portadoras de anticuerpos específicos de cabra contra los tipos de cadenas peptídicas, además de un control positivo. Luego de lavar con solución de PBS- TRIS-H Cl 20 mM, Na Cl mM, tween 20 0.1% pH 7.6 (TBS-T), se incubaron con conjugado anti-Igs. de ratón marcado con peroxidasa. De nuevo se lavaron y se agregó el sustrato 4-cloro-naftol (tabletas), disuelto en metanol, peróxido de hidrógeno al 3% v/v/ en solución TBS. Finalmente, se lavaron las tiras y se observó la presencia de bandas.

##### **Determinación de la especificidad y actividad de los ACS. M. por ELISA e IFI.**

Los sobrenadantes fueron nuevamente probados por ELISA, de igual forma que en los casos anteriores.

Para IFI, se utilizaron láminas con diferentes estadios del parásito: anillos trofozoitos y esquizontes; diluyéndolos 1/10.

##### **Identificación de proteínas por los ACS.M., mediante electroforesis SDS-PAGE e inmunoelectrotransferencia**

Las proteínas de esquizontes y de las membranas de eritrocitos normales, se separaron en geles de poliacrilamida, SDS: gel concentrado al 4%, en solución



tampón tris-H Cl 0.5 M pH 6.8 y gel separador al 8%, en solución tampón tris-H Cl 1.5 M pH 8.8 (25).

Los extractos se aplicaron al gel en una concentración aproximada de 30 µg de proteína por carril; utilizando como solución de tanque un tampón de tris 0.025 M, glicina 0.192, SDS 0.1% pH 8.3, en una unidad de electroforésis en placa vertical a 10 mA por dos horas y a 80 mA por tres horas.

Los marcadores de peso molecular utilizados, fueron: anhidrasa carbónica 29.000, ovoalbúmina 43.000, albúmina bovina 68.000, fosforilasa B 97.400, Beta-galactosidasa 116.000 y miosina 205.000. Estos marcadores fueron tratados de igual manera que los extractos. Los geles fueron coloreados con azul de coomasie y/o coloración de plata amoniacal para observar las condiciones de la electroforésis.

Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, en una solución transferencia tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 20% en un equipo de electrotransferencia, con una corriente a 10 mA durante la noche (21). Finalizada la transferencia se bloquearon los sitios inespecíficos con una solución de PBS y Tween 20 al 0.05%, durante una hora a temperatura ambiente.

Las membranas con las proteínas transferidas, se expusieron a una dilución de 1/200 de los sueros de los ratones inmunes y normales, como también una dilución 1/10 de los sobrenadantes concentrados, incubando a 4°C durante la noche. El diluyente utilizado fue PBS-TWEEN 20 AL 0.5%, SDS al 0.02% y tritón x-100 al 0.01%. Aparte una tira con los marcadores de peso molecular fue coloreada con una solución de amidoblack.

Después de lavar el exceso de inmunoglobulinas, se incubaron las tiras con una dilución 1/5000 de los conjugados anti-Ig M y anti-Ig g de ratón, molécula completa, marcados con Biotina durante 3 horas a temperatura ambiente. De nuevo se lavaron las tiras y se incubaron con una dilución 1/1000 de inmunoglobulinas de cabra antibiotina marcadas con fosfatasa alcalina; durante 2 horas. Finalmente, después de lavar las tiras se agregó el sustrato de alfa-naftilfosfato 50 mg y fast blue salt 50 mg en 100 ml de una solución tris 0.05 M y cloruro de magnesio de 10 mM, pH 8.6 hasta revelar completamente.

## 5. UTILIZACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES M-45 Y G-172 EN UN ELISA-SANDWICH DE CAPTURA DE PROTEINAS SOLUBLES DE *P. falciparum*.

### En sobrenadantes de cultivo

En microplacas de polivinilo de 96 pozos activadas (Falcon), se pegaron 10 µg de los monoclonales M-45 y G-172, en una solución de carbonatos 50 mM pH 9.6. Luego de incubar a 4°C durante la noche y lavar con PBS-Tween, se bloquearon los sitios inespecíficos con PBS y BSA al 2% durante una hora a temperatura ambiente. Después se agregó sobrenadante a un cultivo de parásitos cuya parasitemia era del 4% diluido 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 en buffer PBS-T y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Inmediatamente después de lavar, se adicionó Ig G anti-*P. falciparum* diluida 1/1000 y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. De nuevo se lavó para agregar conjugado anti-IgG de conejo con fosfatasa alcalina marcado con fluoresceína 1/20000 producido en cabra y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente se lavó y agregó el sustrato PNP en buffer de dietanolamina pH 8.6, para incubar 30 minutos a 37°C. La reacción se paró con soda 3N y se leyeron las absorbancias a 405 nm. Estas y las pruebas anteriores se hicieron por duplicado para luego sacar promedios.

### En sueros de pacientes con malaria

Esta prueba se realizó de igual forma que anteriormente, pero con sueros de pacientes con malaria y sueros normales en forma de "pool", y por separado en diferentes diluciones. Los sueros de malaria se escogieron a partir de pacientes con una infección aguda; algunos de los cuales ya habían tomado alguna droga antimalárica como falcidar. Cabe anotar que los sueros ya habían sido descongelados por lo menos en dos oportunidades.

## RESULTADOS

### 6. OBTENCION DE ANTIGENOS

A partir de volúmenes de 80-120 ml de cultivo, cuyas parasitemias (trofozoitos maduros y esquizontes) eran de 2-3%, se obtuvieron entre 50 y 80 µl de extracto de esquizontes (70%). Al relacionar estos

valores con el número de células parasitadas/ml de eritrocitos, se pudo calcular aproximadamente el número de parásitos en el extracto ( $420 \times 10^6$ ). La razón para hacer estos cálculos proveniente del parásito sino también de los eritrocitos.

La dilución de trabajo utilizada para el antígeno de ELISA generalmente de 1/200, después de titular contra sueros inmunes y normales de ratón.

Para IFI, se determinó que  $10 \times 10^8$  cel/ml era una concentración adecuada para las impresiones de las láminas.

## 7. SEGUIMIENTO DE LA PRODUCCION DE ACS. ANTI-*P. falciparum*

### En ratones

Después de dos meses y a la sexta inmunización 9 ratones fueron positivos hasta la dilución 1/10 y sólo dos hasta la dilución 1/100, por ELISA. Luego de séptima inmunización y tres meses después de la primera; tres ratones alcanzaron un título de 1/80 por ELISA, siendo escogidos para fusión. Después de la última inmunización 3 días antes de la fusión, dos de estos ratones alcanzaron un título de 1/1000, también por ELISA (tabla 1).

TABLA No. 1. ELISA. SEGUIMIENTO DE LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS ANTI-*P. falciparum*

RATONES	D. O. ( 405 nm ) *		
	1/10	1/100	1/1000
1	0.38	0.13	0.80
2	0.16	0.04	—
3	0.74	0.19	0.78
4	0.19	0.05	—
5	0.17	0.05	—
6	0.11	0.05	—
7	0.11	0.04	—
8	0.28	0.06	—
9	0.11	0.02	—
C (+)	0.29	0.12	0.21
C (-)	0.04	0.04	-0.007

\*Las diluciones 1/10, y 1/100 corresponden a muestras después de la sexta inmunización, y la dilución 1/1000 a muestras después de la última inmunización, 3 días antes de la fusión.

TABLA No. 2. TITULO DE ANTICUERPOS ANTI- *P. falciparum* EN SUEROS DE CONEJOS INMUNIZADOS

SUERO CONEJOS	D. O. Promedio (405 nm)			
	1/10	1/100	1/500	1/1500
1. inm.	0.60	0.42	----	----
2. inm.	1.10	0.62	----	----
Desafío	3.00	1.40	0.30	0.21
C. N.	0.26	0.05	0.02	0.05

### En conejos

La producción de anticuerpos anti-*P. falciparum* fue observada después de la primera inmunización. Después del refuerzo y diez días antes de sangrar los animales, se observó un aumento considerable de los anticuerpos (tabla 2).

La concentración de Igs G anti-*P. falciparum* por el ácido octanoico, a partir de 50 ml de suero fue de 17 mg/ml. Al titular esta fracción de Igs por ELISA se determinó que la dilución de trabajo era de 1/1000.

## 8. PRODUCCION DE ACS. M.

### Fusiones

De tres fusiones, en donde se utilizaron diferentes proporciones de células parentales, sólo una tuvo éxito (FS-3). En esta fusión se utilizaron  $100 \times 10^6$  células esplenicas inmunizadas,  $52 \times 10^6$  células de mieloma de ratón, con un 87% de viabilidad y  $5 \times 10^6$  macrófagos peritoneales como células alimentadoras. En FS-3 se obtuvieron 258 pozos con híbridos, del total de placas, lo que correspondió a un 30% de los pozos con células aparentemente fusionadas. El ratón utilizado para esta fusión, se desafió por vía intraperitoneal e intravenosa. Al extraer el bazo se obtuvo un gran número de células estimuladas ( $200 \times 10^6$ ).

### Seguimiento de la producción de ACS. monoclonales

Después de dos semanas de crecimiento de los 258 pozos con híbridos (FS-3), se evaluó la producción de Acs. anti *P. falciparum* por ELISA contra extractos de parásitos y de eritrocitos normales. Sólo un pozo fue clara específicamente positivo (No. 45) para extracto de parásitos, y algunos muy débilmente (Ej No. 208,80 Tabla 3). Los otros presentaban reacción más

TABLA No. 3. SEGUIMIENTO DE LA PRODUCCION DE ACS. M. POR ELISA EN FS 3

Pozo No.	D. O. (405 nm)	
	Eritrocitos P. f.	Eritrocitos Sanos
11	0.44	2.39
13	0.34	2.88
24	0.18	1.58
45	1.10	0.12
80	1.10	0.90
85	0.04	0.46
208	0.12	0.02

fuerte o igual con el extracto de eritrocitos normales. Estos sobrenadantes, además de aquellos dudosos por ELISA como el 172 y el 195, con densidades ópticas cercanas a 0.1, fueron probados con impresiones de eritrocitos infectados con esquizontes y eritrocitos sanos; por IFI. Los sobrenadantes 45, 172 y 195 mostraron fluorescencia clara con la superficie de los eritrocitos infectados, más no con los eritrocitos sanos. Al repetir la IFI días más tarde, sólo presentaron fluorescencia específica los sobrenadantes 45 y 172, seleccionándose para clonación y expansión. El sobrenadante 195 fue descartado por presentar fluorescencia escasa y dudosa, posiblemente porque el hibridoma empezó a disminuir la producción de anticuerpos en ese momento.

#### Expansión y clonación de los híbridos 45 y 172

Luego de seleccionar los híbridos 45 y 172 y ampliarlos, se dividió el crecimiento para criopreservación y clonación. Después de una semana de haber clonado por dilución límite, se seleccionaron los pozos con un solo clon de híbridos. Cuando el crecimiento de las células fue suficiente, se evaluó la producción de anticuerpos. A partir del hibridoma 45 se obtuvieron 26 monoclonos (27% total de pozos), de los cuales 25 presentaron inmunofluorescencia específica contra la superficie de los eritrocitos infectados.

Para el hibridoma 172, sólo 12 de los 27 monoclonos seleccionados presentaron fluorescencia de las membranas de los eritrocitos infectados, pero un poco menos que con los clones 45, observándose puntos o parches más fluorescentes en algunas de las regiones de los eritrocitos infectados. Las IFI se repitieron in-

cluyendo controles negativos (sobrenadantes de células de mieloma y eritrocitos sanos); confirmando los resultados anteriores (Figura 1).

#### Concentración de los ACS.M. en los sobrenadantes 45 y 172

Después de ampliar los clones 45 y 172, se colectó un volumen aproximado de 100 ml. Después de precipitar las proteínas, se obtuvo una concentración aproximada de Igs 520 ug para el sobrenadante 45 y 650 ug para el 172. Ambos mediante lecturas de absorbancia a 280 nm.

#### 9. CARACTERIZACION DE LOS ACS.M. 45 Y 172

##### Subclase y tipo de cadena liviana

Los sobrenadantes 45 y 172 concentrados al ser enfrentados a tiras con anti-Igs de ratón producidas en cabra; revelaron dos tipos de anticuerpos, así: el sobrenadante 45 se identificó como una Ig M, cuya cadena liviana era del tipo kappa. El sobrenadante 172 se identificó como una Ig G2a, cuya cadena liviana también era del tipo Kappa.

##### Especificidad y actividad de los anticuerpos monoclonales M-45 Y G- 172

Por ELISA los resultados fueron completamente negativo. Por IFI, después de enfrentar los Acs. M. a anillos de 12 y 20 horas y esquizontes de 34, 40 y 46 horas de maduración; los resultados mostraron una fluorescencia fuerte de membrana. Esta fluorescencia empezaba a partir de los trofozoitos de 20 horas y aumentaba con el tiempo de maduración del parásito (Tabla 4); siendo más intensa y generalizada para M-45 que para G-172 (Figura 2). Los controles funcionaron correctamente mostrando diferencia clara entre positivo normal.

##### Identificación de las proteínas del parásito por electroforesis SDS-PAGE e inmunotransferencia

Después de colorear los geles con una solución de plata amoniacal, los extractos de esquizontes y proteínas solubles liberadas espontáneamente en el medio, mostraron diferencias claras.

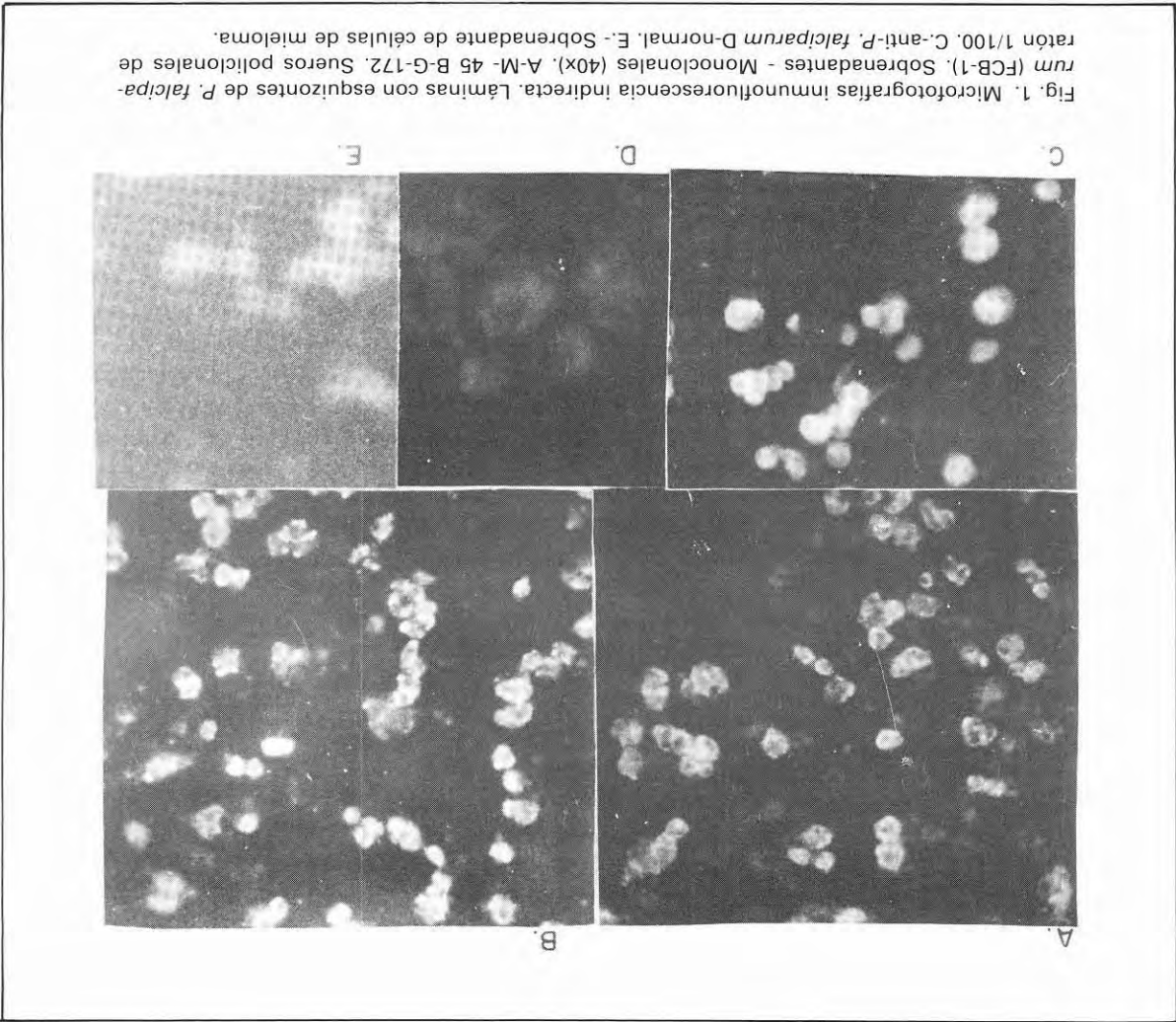


TABLA No. 4. INMUNOFLORESCENCIA CON LOS ACS. N-45 Y G-172

N-45		G-172	
PARASITOS	1/5	1/10	1/10
Anillos (12h)	---	---	---
Anillos (20h)	+++	++	++
Esquizontes (34h)	++++	++++	+
Esquizontes (40h)	++++	++++	++
Esquizontes (46h)	++++	++++	++

cuyos pesos moleculares oscilaron entre 200 y 10 kd. De acuerdo con estos resultados, se decidió trabajar con este último extracto para las electroforesis y transferencias posteriores.

En una primera transferencia, se enfrentó un extracto de esquizontes sin tratamiento con saponina y un extracto de eritrocitos sanos, con Ac. M. M-45 diluido 1/10, sueros control normal e inmune de ratón diluidos 1/200. Después de revelar, se observó que M-45 detectó 13 bandas con el extracto de esquizontes, cuyos pesos moleculares aproximados estaban entre 190 y 31 kd. Algunas de estas proteínas podrían ser equivalentes a aquellas reveladas con el suero de ratón inmune. Con este suero se revelaron 15 bandas cuyos pesos moleculares estaban entre 200 y 30 kd. El suero

Entre las proteínas solubles se revelaron dos bandas que correspondían a un peso molecular aproximado de 60 y 20 kd. Por el contrario, con el extracto de esquizontes se resolvieron más claramente 33 bandas



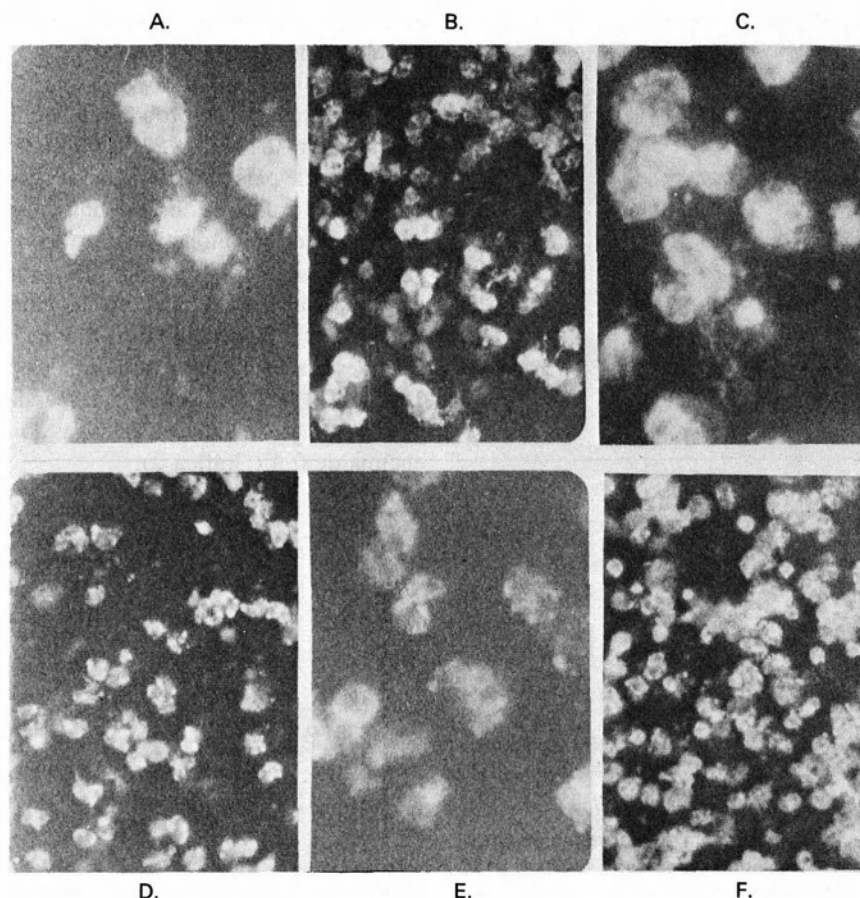


Fig. 2. Microfotografías inmunofluorescencia indirecta. Esquizontes Trofozoitos Maduros *P. falciparum*  
A.B.C. Sobrenadante concentrado - Monoclonal M-45  
D.E.F. Sobrenadante concentrado - Monoclonal G-172

del ratón normal sólo mostró 3 bandas bien definidas comparables con algunas del ratón inmune, pero de menor intensidad.

Posteriormente se utilizó un extracto de esquizontes tratado con saponina para eliminar la mayor cantidad de proteínas provenientes de los eritrocitos, y que podrían interferir en los resultados finales. También se decidió diluir los monoclonales 1/30, 1/60, 1/90). El Ac. M., M-45, reveló una banda fuerte y bien definida correspondiente a una proteína de peso molecular de 72 kd y otras dos mas pequeñas de menor intensidad de 30 y 26 Kd aproximadamente. Estas dos últimas podrían ser productos de degradación de la

proteína de 72 (Figura 3). Con los extractos de eritrocitos sanos no se observó banda alguna.

Con el Ac.M. G-172, sólo se observó una banda muy tenue y estrecha con el extracto de esquizontes que correspondía a un peso molecular aproximado de 120 kd (Figura 3).

#### 10. ELISA SANDWICH CON LOS MONOCLONALES M-45 Y G-172

De acuerdo con las recomendaciones para las pruebas de ELISA sandwich, se utilizó un exceso de la mezcla de Acs. M. M-45 y G-172; 10 ug/ml, para adherir a las placas.

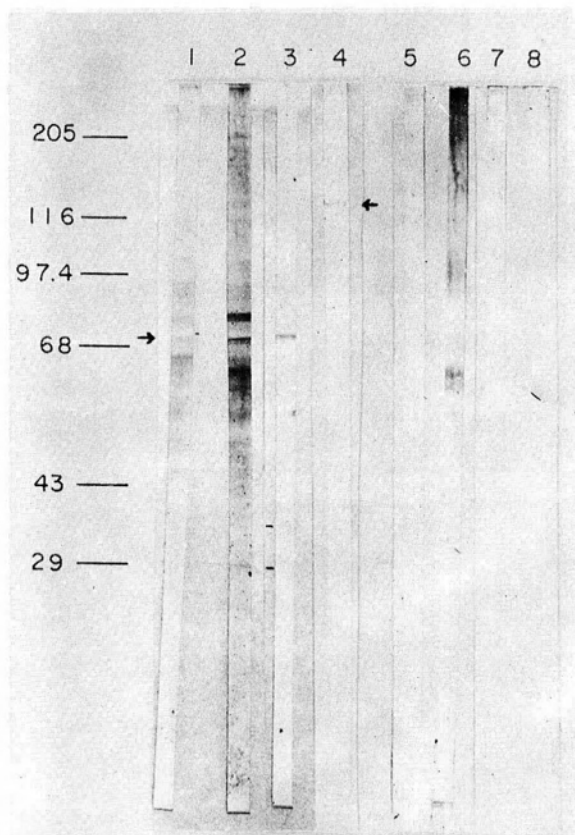


Fig. 3. Inmunoelectrotransferencia. Membranas de Nitrocelulosa con extractos de esquizontes de *P. falciparum* (1, 2, 3, 4) y eritrocitos normales (5, 6, 7, 8). 1 y 5 - Suero de ratón normal 1/200. 2 y 6 - Suero de ratón inmune anti-*P. f.* 1/200. 3 y 7 - Ac.M - 45 1/10. 4 y 8 - Ac.M - G-172 1/10. Izquierda marcadores de *P. molecular*: Miosina (205 kd), B-Galactosidasa (116 kd), albumina de huevo (43 kd), anhidrasa carbónica (29 kd).

### En sobrenadantes de cultivo

Las diluciones de los sobrenadantes de los cultivos (parasitemia 4%) y los del medio de cultivo sin parásitos; mostraron diferencia clara entre positivo y normal. Las lecturas fueron disminuyendo a medida que se aumentaron las diluciones, y al graficar se observó una línea recta descendente. Las densidades ópticas obtenidas fueron desde 0.75 hasta 0.16 (Gráfica 1).

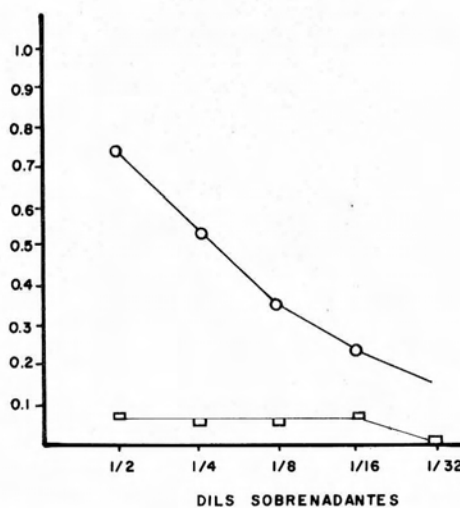
### En sueros de pacientes con malaria

La mezcla de sueros "pool", tanto de malaria como normales, fueron diluidos hasta 1/60 y los resultados fueron comparables con los de los sobrenadantes. Las

densidades ópticas mostraron nuevamente diferencia clara entre los sueros positivos y normales, desde la dilución 1/10 (Tabla 5).

Posteriormente, se probaron 5 sueros cuyas parasitemias eran: 0.17%, 0.57%, 0.08%, 0.47%, 0.12% y 5 sueros de personas que nunca habían tenido malaria. En esta prueba se observó una actividad específica de captura de los monoclonales; posiblemente contra antígenos solubles liberados del parásito y conservando las misma tendencia de las pruebas anteriores. La dilución 1/20 produjo un 100% de diferencia entre las muestras de malaria y las normales. Para la dilución 1/40 sólo el 80% de diferencia, tomando siempre como positivas aquellas muestras cuyas D.O. estaban por encima de 0.4 (Gráfica 2).

Elisa sandwich Los monoclonales (M45 y G172) y sobrenadantes de cultivo.

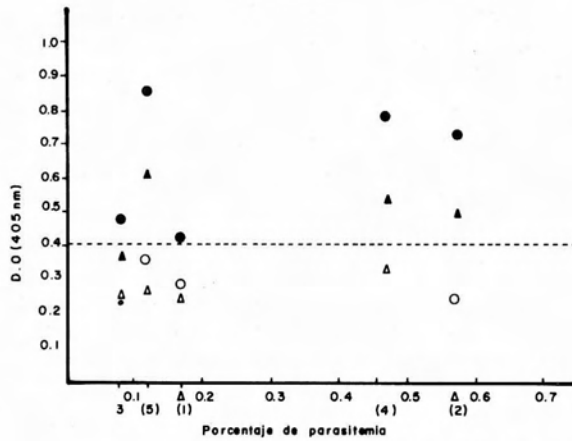


Gráfica No. 1 ○—○ sobrenadantes cultivo *Plasmodium falciparum*  
□—□ medio de cultivo sin suero

TABLA No. 5. ELISA SANDWICH CON M-45, G-172  
Y "POOL" DE SUEROS HUMANOS

SUEROS "POOL"	D. O. (405)				
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160
<i>P. falciparum</i>	0.78	0.59	0.40	0.19	0.123
NORMAL	0.11	0.07	0.05	0.03	0.02

Elisa sandwich con los Monoclonales (M45 y G172), 5 sueros con *Plasmodium falciparum* y 5 controles normales.



## DISCUSION Y CONCLUSIONES

En este trabajo, se produjeron e identificaron dos Acs. M. que reaccionaron con proteínas de *P. falciparum* (FCB-1); mediante inmunolectrotransferencia e inmunofluorescencia. El Ac. M. M-45 identificó un polipéptido de 72 kd, produciendo un banda de mayor identidad y otras dos con menor intensidad, de menor peso molecular, 30 y 26 kd (Figura 3). Con el monoclonal G-172, se observó una sola banda muy tenue que correspondía a una proteína de 120 kd. El hecho de que una Ac. M. reconozca varias bandas, como es el caso de M-45, puede deberse a que hay epítopes compartidos, o procesamiento de las proteínas de mayor peso molecular. Resultados similares han sido reportados en varias oportunidades (25, 12, 14), en donde se establece que los péptidos identificados pueden pertenecer a una sola familia de moléculas derivadas del mismo precursor. Freeman y Holder (11), demuestran una proteína de 83 kd presente en los esquizontes maduros, que puede ser parte del merozoito, al igual que otro fragmento de 60 kd que es producido durante la invasión de los eritrocitos por los me-

rozoitos, siendo ambos el resultado de proteólisis de polipéptido P-195. Es muy probable que las proteínas identificadas por M-45, sean el resultado de un proceso de degradación durante el rompimiento del parásito.

Los ratones utilizados para las inmunizaciones necesitaron gran cantidad de antígeno, además de inmunizaciones prolongadas, para producir una respuesta humoral significativa (Tabla 1). Esto es muy explicable, ya que el inóculo fue en todos los casos, una mezcla muy compleja de proteínas del parásito y los eritrocitos, en donde no siempre la cantidad de proteínas del parásito pudo ser suficiente.

El desafío de los ratones tres días antes de la fusión por vías intravenosa e intraperitoneal, resultó, por cuanto mejoró la estimulación de las células inmunocompetentes: observándose aumento del número de células para la fusión y título de Acs. por ELISA (Tabla 1). Esta estimulación es muy importante porque va a determinar la cantidad y variedad de linfocitos específicos que podrían fusionarse y dar lugar a hibridomas productores de Acs. monoclonales (24).

En el caso de los conejos la respuesta al antígeno fue más rápida y considerable (Tabla 2).

Aunque no podemos saber si los monoclonales reaccionaron con uno o varios antígenos de los parásitos; por inmunofluorescencia, fue posible observar dos patrones diferentes. M-45 mostró una fluorescencia generalizada sólo alrededor de la superficie de eritrocitos infectados con parásitos maduros; y con diferente intensidad en un mismo campo microscópico, posiblemente relacionada con la cantidad de epítopes identificados expresados en la célula. De acuerdo con esto, el (los) epítipo (s) identificado (s), podrían estar asociados a las membranas que rodean los parásitos (26), o corresponder a proteína dispersa en el interior de la célula parasitada (Figura 2).

El monoclonal G-172 produjo también una fluorescencia de la membrana de los eritrocitos infectados, pero con parches más fluorescentes en algunas regiones, que podrían corresponder a alguna región de los merozoitos o los esquizontes. Este patrón de fluorescencia ha sido observado en otras oportunidades, en donde los monoclonales han identificado proteínas de 41, 93 y 39 Kd (27). Estas proteínas están presentes en eritrocitos infectados por esquizontes de *P. falciparum*.

Por el contrario cuando se enfrentaron eritrocitos sanos a los monoclonales, M-45 y G-172 no hubo fluorescencia alguna y tampoco presencia de bandas por inmunotransferencia.

Más adelante, continuando con la IFI y enfrentando M-45 y G-172 a anillos y trofozoitos jóvenes (12-20 h); se observó una fluorescencia más escasa y tenue, comparándola con aquella producida por los parásitos a partir de las 40 h, principalmente (Tabla 4). De aquí, podríamos deducir que parte de los determinantes antigénicos identificados por los Acs. M. comienzan a expresarse más tempranas del parásito 20 h, quedando acumuladas en gran cantidad durante la maduración, como han demostrado Hall R. y col. (28), con la proteína P-190 de la superficie del parásito.

La evidencia de que M-45 y G-145 son diferentes está dada parcialmente, por los dos patrones de IFI observados, los dos isotipos de Igs (Ig-M e Ig G2a), y el tamaño molecular de las proteínas identificadas por inmunotransferencia (72, 30, 26 y 120 kd), como se ha reportado en otros casos (29).

Las pruebas de ELISA, consideradas como pruebas más sensibles que las de fluorescencia, no pudieron detectar la reacción de las proteínas del parásito con los monoclonales en los seguimientos después de la clonación. Esto puede ser ocasionado porque los epítopes identificados por los Acs. M, no se expusieron adecuadamente en el antígeno utilizado para el ELISA, o de igual forma como lo hicieron en las pruebas de IFI e inmunotransferencia (30). Además, la unión de Ac. M y el determinante antigénico no siempre es tan estable, como es el caso de las uniones monovalentes en donde es más fácil que el Ac. se desprenda de su epítope. Otra posibilidad es que los antígenos aún estando presentes, lo estuvieran en una cantidad por debajo del límite de detección y/o la cantidad de Acs. M era muy baja en ese momento.

Como se mencionó inicialmente, las proteínas solubles encontradas en los sueros de los pacientes y en los sobrenadantes de cultivo del *P. falciparum*, han sido estudiadas en numerosas ocasiones (31, 32, 33). En 1984, en el Laboratorio de Bioquímica del INS se reportaron tres polipéptidos de 77, 48 y 36 kd, presentes en los sobrenadantes del cultivo cuando el merozoito invade nuevos eritrocitos (34). Estas proteínas son susceptibles de proteólisis y se fragmentan en péptidos de varios tamaños.

De acuerdo con la observación hecha por Jepsen y Andersen (5), acerca de la similitud en la identidad inmunoquímica de los antígenos solubles en sueros de pacientes con malaria y sobrenadantes de cultivos, es muy posible que los exoantígenos identificados por M-45 y G-172 en los ELISA correspondan a aquellas proteínas circulantes en los sueros de pacientes con infección malárica aguda que se probaron en este primer ensayo. En esta prueba de sensibilidad y especificidad de la reacción fue de un 100% para la dilución 1/20 de los sueros; tomando como positivos aquellos valores por encima de 0.4. Sin embargo, al aumentar la dilución 1/40, la sensibilidad disminuyó a un 80% (Gráfica 2). Estos datos son preliminares, pues es necesario hacer una validación estadística con un número representativo de muestras problema y normales. La complejidad y gran variedad de antígenos solubles ya ha sido demostrada en otros casos (35), cuando se han hecho estudios epidemiológicos para determinar la incidencia de la infección.

Es indispensable continuar con el estudio de los Acs. M identificados en este trabajo, para determinar exactamente su comportamiento; al mismo tiempo que la ubicación exacta de las proteínas con las que reaccionan.

## SUMMARY

This paper describes the production and characterization of two monoclonal antibodies against *P. falciparum* soluble proteins. One of the monoclonal antibodies identified as M-45 detected one protein of 72 kd and two more of 30 and 26 kd in a *P. falciparum* schizont extract, by immunoelectroblotting. The other one, G-172 detected a protein of 120 Kd.

Moreover, the two monoclonal antibodies showed different immunofluorescence patterns, both recognized Schizont infected erythrocytes: M-45 (M isotype) produced a generalized and uniform fluorescence, while G-172 (G2a isotype) produced patches of higher intensity in some regions of the schizont.

Later on, M-45 and G-172 were used in an ELISA sandwich technique as capture antibodies for *P. falciparum* soluble antigens. Culture supernatants and five malaria infection sera were assayed. The results showed a 100% sensibility and specificity when the dilution sera was 1/20 and 80% sensibility for the 1/40



dilution. According to these results, it might be feasible to use these monoclonal antibodies in an ELISA test to follow the course of malaria infection.

### AGRADECIMIENTOS

Al doctor Moisés Wasserman por su acertada dirección, rigor científico y continuo apoyo. Al doctor Tsuneo Kamiyama por su valiosa asistencia técnica y a la Agencia de Cooperación Internacional Japonesa por el aporte económico ofrecido. A todas aquellas personas que de alguna forma contribuyeron a la realización de este trabajo.

### BIBLIOGRAFIA

1. Wilson RJM. The release of antigens by *P. falciparum*. Parasitology, 1975; 71:183.
2. Chumpitazi B, Kupka P, Ambroise-Thomas P, Gros A and Thelu J. Immunological characterization of *P. falciparum* exoantigens Int Parasit, 1987; 17: 1175.
3. Gabrielsen A, James JR, Jensen B, and Roland MT. Identification and partial characterization of exoantigens derived from medium uses to culture *P. falciparum*. Am Trop Med Hyg, 1983; 32: 671.
4. Wilson RJM. Antigens associated with *P. falciparum* infections in man. The Lancet, 1969; 201.
5. Jepsen S, and Andersen BJ. Immunosorbent isolation of antigens from the culture medium of in-vitro cultivated *P. falciparum*. Acta Path Microb Imm Scand Sect C, 1981; 89: 99.
6. Wilson RJM. The production of antigens by *P. falciparum* in-vitro Inter J Parasit, 1974; 4: 537.
7. Khusmith S, Tharanvanij S, Kasemuth C, and Bunna BD. Two-site Immunoradiometric assay for detection of *P. falciparum* antigen in blood using monoclonal and polyclonal antibodies. J Clinical Microb. 1987; 25: 1467.
8. Pirson PJ. and Perkins M. Characterization with monoclonal antibodies of a surface antigen of *P. falciparum* merozoites. J Immun, 1985; 134: 1946.
9. Saul A, Myler P, Schofield L, and Kidson C. A high molecular weight antigen in *P. falciparum* recognized by inhibitory monoclonal antibodies Parasit Immun, 1984; 6: 39.
10. Shamansky LM, Liv HY, Hagen L, and Ristic M. Purification and characterization of culture derived exoantigens of *P. falciparum*. Molec Bioch Parasit, 1985; 17: 299.
11. Holder A, and Freeman RR. Byosynthesis and processing of *P. falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. J Exp Med, 1982; 156: 1528.
12. Lyon JA, Haynes JD, Diggs CI, Chulay JD, Haidaris CC, and Patt-Rositten J. Monoclonal antibody characterization of the 195 Kd major surface glycoprotein of *P. falciparum* malaria shizonte and merozoites: Identification of additional processed products and a serotype-restricted repetitive epitope. J Immun, 1987; 138: 895.
13. Wilson RJM, Mc Gregor IA, and Hall RJ. Resistance and recurrence of S-antigens in *P. falciparum* infections in man. Transac roy Soc Trop Med Hyg, 1975; 69: 466.
14. Taylor DW, Evans CB Hennesy GW and Aley SB. Use of two-sited monoclonal antibody assay to detect a heat-stable malarial antigen in the sera of mice infected with *P. yoelli*. Infect Immun, 1986; 51: 884.
15. TDR News. Multicentre trial of antigen ELISA for sleeping sickness Ed. by UNDP/WHO/WB, Dec 1989; No. 3.
16. Trager RW and Jensen J. Human malaria parasites in continuous culture Science, 1976; 195: 673.
17. Rivadeneira EM, Wasserman M and Espinal C. Separation and concentration of schizonts of *P. falciparum* by Percoll gradients. J Protozool 1983; 30: 367.
18. Zuckerman A, Spira D, and Hamburger J. A procedure for the harvesting of mammalian Plasmodia. Bull. WHO, 1967; 37: 431.
19. Bradford MM. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem. 1976; 72: 248.
20. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1976; 227: 689.
21. Towin H, Stahelin T and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Proc Natl Acad Sci, U.S.A. 1979; 76: 4350.
22. Steinbuch M, and Audrax R. The isolation of Ig g from mammalian sera with the aid of caprylic acid. Archiv Bioph, 1969; 134: 279.
23. Lane RD, Crissman RS, and Ginn S. High efficiency fusion procedure for producing monoclonal antibodies against week immunogens. Meth Enz, 1986; 21: 183.
24. Goding J. Antibody production by hybridomas. J Immun Meth, 1980; 39: 285.

25. Brown GV, Coopel RL, Urbova H, Dumont RJ, and Andres RJ. *Plasmodium falciparum*: Comparative analysis of erythrocyte stage dependant protein antigens. *Exp Parasit*, 1981; 53: 279.
26. Marsh K and Howard RJ. Antigens induced on erythrocytes by *P. falciparum*: Expression of diverse and conserved determinants. *Science*, 1986; 231: 150.
27. Howard RD, Stanley HA, Campbell GH, and Reese RT. Proteins responsible for a punctuate fluorescence pattern in *P. falciparum* merozoites. *Am Trop Med. Hyg.* 1984; 33: 1055.
28. Hall R, Osland A, Hyde JE, Simmons DL, Hope IA, and Scaife J. Processing polymorphism and biologic significance of P-190, a major surface antigen of the erythrocyte forms of *P. falciparum*. *Molec Biochem Parasit.* 1984; 11: 61.
29. Charoenvit Y, Leef MF, Yuan LF, Sedegah M, and Beaudin RL. Characterization of *P. yoelli* monoclonal antibodies directed against stage-specific sporozoite antigens. *Infect Immun.* 1987; 55: 604.
30. Demedets P, Vermeulen Van Overmeir C, and Wery M. Simultaneous use of *P. falciparum* crude antigen and red blood cell control antigen in the enzyme-linked immunosorbent assay for malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1987; 36: 257.
31. Myler P, Chiu S, Upcroft J, Castelino D, and Kidson C. Immunoprecipitation of biosynthetically labeled, stage-specific proteins from cultured *P. falciparum* using inhibitory human sera. *Ans. J Exp Biol Med Sci.* 1982; 60: 91.
32. Rodríguez Da Silva L, Loche M, Dayal R, and Perrin L. *P. falciparum* polypeptides release during in-vitro cultivation. *Bull. WHO*, 1983; 61: 105.
33. Schoffield L, Saul A, Myler P, and Kidson C.H. Antigenic differences among isolates of *P. falciparum* demonstrated by monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 1982; 38: 893.
34. Díaz CA. Estudio de las proteínas solubles liberadas espontáneamente por el parásito *P. falciparum* (expoproteínas). Tesis Master en Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, 1984.
35. Mc Bride, Walliker D, and Morgan G. Antigenic diversity in the human malaria parasite. *Science*. 1982; 217: 254.